

MARCADORES GENÉTICOS PARA LA TRAZABILIDAD DE PRODUCTOS ACUÍCOLAS, ESPECIAL ÉNFASIS EN *HALIOTIS SP.*

Ivonne Lozano ⁽¹⁾ y Juan Ortiz T. ⁽²⁾

(1) Programa de Doctorado en Acuicultura
Universidad de Chile

(2) Programa de Doctorado en Acuicultura
Universidad de Chile
ESPE, SENESCYT

RESUMEN

Haliotis sp. es un molusco de alto valor comercial y fácilmente vulnerable a la pesca extractiva, lo que ha provocado disminución en sus capturas a 8,7mil toneladas métricas (mtm). Esta cifra se contrasta con el cultivo intensivo, que representa a nivel mundial 40,836 mtm. En Chile y México, la acuicultura ha tenido un crecimiento anual sostenido del 16%, siendo los moluscos un aporte significativo a la industria alimentaria de estos países. Dentro del grupo de los gasterópodos, la principal especie de cultivo es el Abulón rojo (*Haliotis rufescens*) la cual creció en los últimos 10 años en un 95%, llegando a una producción de 897 tm en esta región. La disminución de poblaciones nativas por la ecología propia de la especie, presión de comercialización, malas prácticas de pesca, globalización de cultivo, movimiento de semilla y reproductores y alta demanda del producto por el mercado asiático, avala la búsqueda de tecnologías alternativas para el seguimiento de poblaciones naturales y de cultivo. La búsqueda de modelos para la trazabilidad del Abulón rojo, hace inminente la utilización de herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares, que permitirán determinar la autenticidad de origen; control y erradicación de enfermedades; protección y bioseguridad de poblaciones naturales; aseguramiento de marketing para producciones comerciales y orgánicas. De esta manera se pretende visualizar formas eficientes y confiables de evaluar la trazabilidad de especies acuáticas, permitiendo el cumplimiento de las regulaciones internacionales de inocuidad alimentaria, que son factores determinantes en la búsqueda de la nueva acuicultura.

En este trabajo se hace un análisis del componente molecular, relacionando a modelos de trazabilidad para la acuicultura, herramientas genéticas para estos modelos y posibles áreas de desarrollo tecnológico no solo para *Haliotis rufescens*, sino para otras especies acuáticas de interés comercial.

Palabras Claves.- Trazabilidad, *Haliotis rufescens*, marcadores moleculares, SSR – EST.

ABSTRACT

Haliotis sp. is a commercially valuable shellfish and easily vulnerable to fishing and quarrying, which has led to decline in their catch to 8700 metric tons. This figure contrasts with intensive cultivation, which represents 40836 mt worldwide. In Chile and Mexico, aquaculture has had a sustained annual growth of 16%, and shellfish contribute significantly to the food industry in these countries. Within the group of gastropods, the main crop species is the red abalone (*Haliotis rufescens*) which grew in the last 10 years by 95%, reaching a production of 897 tonnes in this region. The decline of native populations in the ecology of the species, market pressure, poor fishing practices, globalization of culture, movement of seed and broodstock and high product demand in the Asian market, supports the search for alternative technologies for monitoring of natural and cultivated populations. The search for models to trace

Recibido: Febrero de 2011
Aceptado: Junio de 2011

the red abalone, urgent to use biotechnology tools such as molecular markers that will identify the authenticity of origin, control and eradication, protection and biosecurity of natural populations of marketing insurance to commercial production and organic. This approach is intended to display efficient and reliable ways to assess the traceability of aquatic species, allowing compliance with international food safety regulations, which are determining factors in the search for new aquaculture.

In this paper a molecular component analysis, relating to traceability models for aquaculture, genetic tools for these models and possible areas of technological development not only for *Haliotis rufescens*, but for other aquatic species of commercial interest.

Keywords.- Traceability, *Haliotis rufescens*, molecular markers, SSR - EST.

1. INTRODUCCIÓN

Haliotis sp. es una de la especies principales en el cultivo Acuícola de Chile y México. A diciembre del 2008 se produjeron 897tm aproximadamente, con un valor sobre los 35 millones de dólares (FAO,2008). En el 2002 la Unión Europea emite una regulación con el fin de identificar el nombre comercial, nombre científico, origen, método de producción (captura ó cultivo) para todo los productos alimenticios, así como los de pesca y acuicultura. En este contexto, Chile ha alcanzado un importante desarrollo en las exportaciones de alimento y en especial agrícolas, llegando a 3,82 mil millones dólares al 2007. En el caso de los EEUU, como consecuencia al suceso del 11 de septiembre, en el 2005, emite su regulación US Bioterrorism Act, donde se requiere que todo alimento y cadena alimenticia sea trazable, desde la identificación basada en características morfológicas y organolépticas hasta el proceso de elaboración de productos. Además, los incentivos financieros promovieron la sustitución de especies de alto valor comercial, como el Abulón rojo, por el loco chileno en el mercado Chino, ó bien el Abulón verde (*Haliotis discus hanai*) por el híbrido de Abulón en el mercado Japonés. (Jacques 2007; Jacquet, 2008)

La falta de herramientas eficientes y confiables para el perfeccionamiento de trazabilidad y seguridad alimentaria de productos acuáticos impide que las regulaciones ambientales, de inocuidad alimentaria y eco-decisiones de los consumidores sean efectivas. La estrategia eficaz de trazabilidad más adecuado y rentable para una industria en particular, dependerá en gran medida de la organización de esa industria, por ejemplo, el grado de registro en la transferencia de peces, huevos y larvas entre niveles. (Hastein et al., 2001)

Existen varios países, entre ellos Tailandia , con un crecimiento importante en la acuicultura en los últimos 10 años, y que ha implementado algunos programas para la sostenibilidad de la industria acuícola exportable como son: buenas prácticas de Acuicultura (BPA), Código de Conducta para el cultivo sostenible del camarón (CoC), el Programa Nacional de Control de Residuos (NRCP) para el control de cloranfenicol y nitrofuranos, el movimiento de documentos obligatorios desde los criaderos y granjas a través de plantas de proceso para garantizar el seguimiento eficaz de los productos terminados (DM), buenas prácticas de fabricación (BPF), el análisis de peligros y puntos críticos dentro del proceso (HACCP) y por último la implementación de un sistema de trazabilidad "TraceShrimp", involucrando el intercambio de información de las fábricas de alimentación, a través de la agricultura, proveedores, centros de transformación, y productos terminados. (Borresen, 2008; Liao et al., 2009; Jiang, 2010)

De esta manera, la búsqueda de modelos y utilización de herramientas para la trazabilidad de productos acuáticos, para países como Chile y México y en especial para la producción del Abulón rojo, hace inminente el empleo de herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares, que permitirán determinar la autenticidad de origen de poblaciones naturales y cultivo; control y erradicación de enfermedades; protección y

bioseguridad de poblaciones naturales y el aseguramiento de marketing para producciones comerciales y orgánicas.

Dentro de las nuevas estrategias del cultivo del Abulón, deben contemplarse las nuevas tendencias hacia el cumplimiento de acuicultura sostenible y sustentable, regulados por la Aquaculture Stewardship Council, los mismos que empezarán a operar en el 2011 (www.worldwildlife.org/abalonedialogue). Dentro de ellos se contemplan las limitaciones a la manipulación genética y operación del producto. Estos nuevos requerimientos internacionales, ayudarán a minimizar el impacto ambiental y social, relacionado al cultivo del Abulón y otras especies acuáticas.

El presente trabajo busca un aporte de información relevante al uso de herramientas moleculares en la trazabilidad de productos acuáticos como el *Halotis rufescens*, así como la oportunidad de desarrollar nuevas investigaciones para la sostenibilidad de esta especie.

2. TRAZABILIDAD

ISO (Internacional Organization For Standardization) define trazabilidad como “la habilidad de rastrear la historia, aplicación ó lugar el cual está bajo consideración” y “trazabilidad es una serie de registro de identificaciones”. La trazabilidad es definida por el Codex Alimentarius como “rastreo hacia delante ó hacia atrás mediante registros electrónicos ó documentados” (Golan et al., 2005). La Organización Mundial de Comercio (World Trade Organization) requiere que la trazabilidad al ser utilizada por un país como constante importante debe ser justificada científicamente y homologada con los estándares locales aplicados en cada país. Sparks (2002) define trazabilidad como “La habilidad de seguir y documentar el origen e historia de un producto alimenticio, desde su genética básica hasta la mesa, el rastreo abarca la identificación de toda práctica y procedimiento que han impactado la vida de un producto dado, y es documentado y se encuentra disponible para el comprador ó cualquier participante de la cadena de distribución. Saunders (2004), indica que las fortalezas de la identificación de animales vivos criados en encierro son: (1) Protección de los animales vivos de criadero nacionales-prevención de enfermedades y bioterrorismo, así como asegurar un control y limitar los daños. (2) Promueve la confidencialidad del consumidor-asegurando la entrada al mercado global y la entrega de promesa de marca vía un aseguramiento adicional y la autenticidad del manejo. (3) Valor agregado como beneficio en el manejo de la cadena de distribución creado por el uso de genética, origen de la producción, insumos ó metodología de producción.

3. SISTEMAS DE TRAZABILIDAD

Dentro de los sistemas de trazabilidad utilizados actualmente se tienen: microchips de radiofrecuencia, códigos de barras, scanner de retina y DNA fingerprints. Mediante el uso de tecnología de DNA los sistemas de trazabilidad se vuelven menos complejos y más económicos con respecto al uso de etiquetas y código de barras los cuales además de su complejidad se encuentran limitados en precisión y costo. Varias tecnologías han sido desarrolladas en la búsqueda de herramientas efectivas. Turchini et al., (2009) aborda esta cuestión en estudios con bacalao de cultivo intensivo de diferentes fincas (recirculación, jaulas flotantes) en diferentes áreas geográficas, utilizando una combinación de isótopos estables, en particular el delta C-13 y delta N-15 en dietas comerciales, y el delta S-18 en peces vinculados a fuente de aguas específicas. Así, la combinación de estos isótopos puede diferenciar peces de varios orígenes. Otras técnicas como análisis proximales de tejidos entre muestras silvestres y de cultivo no son tan informativas y discriminatorias, además los sistemas de DNA utilizan el propio DNA del animal con código identificador tanto para este, como de los productos derivados de este, permitiendo una trazabilidad del 100%. (IdentíGEN 2004)

4. TRAZABILIDAD PARA LA AUTENTICIDAD DE ORIGEN

En la acuicultura, existen varios avances en análisis de autenticidad de especies marinas incluyendo técnicas bioquímicas, DNA fingerprinting y assays. Existe de igual manera un banco de datos en construcción para catalogar la genética molecular de diferentes alimentos de origen marino, estas técnicas son relativamente económicas requieren de tecnologías complejas y recurso humano calificado, lo cual no es una realidad en los países en vías de desarrollo de donde proviene la mayor parte del alimento de origen marino, por lo que mientras estos países sean económicamente y políticamente viables, la trazabilidad se vuelve un componente imprescindible en el mercado internacional.

5. TRAZABILIDAD PARA LA PREVENCION Y CONTROL DE ENFERMEDADES.

Bailey (2004) reporta el primer esfuerzo del gobierno de Estados Unidos para un programa nacional de identificación de especies llamado NIWP (National Identification Work Plan) este programa inicia su formación en abril de 2002 con más de 30 diferentes asociaciones de producción animal y coordinadas por el Instituto Nacional de Agricultura Animal de los Estados Unidos (NIAA), el programa fue aceptado en 2002 por US Animal Health Association (USAHA).

6. MARCADORES MOLECULARES COMO HERRAMIENTA DE TRAZABILIDAD EN ABALON

Los programas de selección y mejoramiento genético son procesos redituables tanto para actividades agrícolas como pecuarias (Pérez & Ortiz, 2005). En Chile y México se han implementando programas de selección en crecimiento y supervivencia mediante esquemas basados en selección masal o familiar (Winkler et al., 2010).

El Abulón rojo es una especie histórica de alto valor comercial y por la disminución en las pesquerías y el aumento en el valor de mercado ha inspirado numerosos esfuerzos en su cultivo. Argue y Alcívar (2002) indican, que hay falta de información sobre genes responsables de caracteres económicos como crecimiento y tolerancia y/o resistencia a virus en varias especies acuáticas. Esta información permitirá el entendimiento de la ubicación de loci de caracteres cuantitativos (QTL) en mapas genéticos lo cual puede ser utilizado para selección asistida con marcadores moleculares y la clonación de genes responsables de dichos rasgos. El conocimiento de estos rasgos, serán elementos claves para procesos de trazabilidad en la industria del Abulón rojo.

7. MODELOS DE TRAZABILIDAD PARA PRODUCTOS ACUATICOS.

Dentro de las cadenas de suministros alimenticios, para simular y optimizar las actividades dentro de los procesos, los modelos matemáticos cumplen un real desafío para la distribución, planificación y manejo óptimo de las materias primas que se utilizan ampliamente. Sin embargo, el modelado basado en una visión holística de la cadena incluyendo a varios de los agentes de la cadena de suministro es menos estudiado, y los aspectos relacionados con los alimentos tales como la calidad y vida útil no son tomados en consideración.

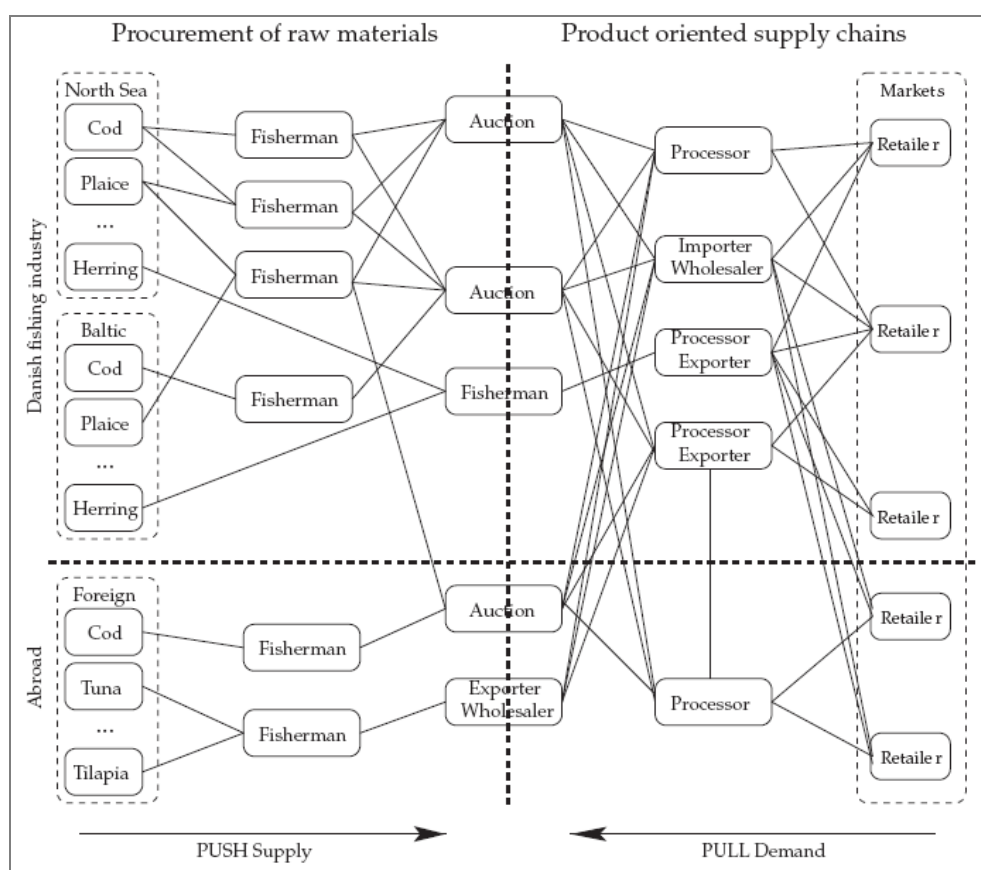


Figura 1 Modelo de la cadena alimenticia para productos pesqueros en Dinamarca (Jensen et al., 2010).

En la industria pesquera el valor añadido cumple un rol fundamental para mejorar los ingresos y permitir la rentabilidad en la industria, además de considerar aspectos claves dentro del proceso productivo como la perecibilidad del producto, en momentos específicos de la cadena. El comportamiento de las cadenas productivas en productos pesqueros, están claramente definidos por dos actores: productores y consumidores. Estos dos actores permitirán que el desarrollo de los procesos productivos se comporte de cierta manera. Sin embargo los productos pesqueros, requieren de un seguimiento más eficiente y rápido para determinar su estado de calidad y vida útil. Por supuesto los requerimientos de certificación de origen y manejo de certificaciones en los procesos con estándares internacionales serán un requisito particular. (Borresen et al., 2008)

En resumen las cadenas de suministro en la industria pesquera se caracterizan por la incertidumbre del suministro de las materias primas, que pueden ser los productos pesqueros de bancos naturales o de cultivo. Además la comercialización, en donde la entrega del producto de primera mano, a menudo se utiliza para equilibrar la balanza entre la oferta y demanda, provoca por lo general, la mezcla de lotes, calidad del producto, mezcla de especies, generando que el producto real, no llegue a su destino final acorde a las exigencias de la demanda específica.

Los compradores probablemente también estarán interesados en otros atributos de estos productos como el respeto al medio ambiente o el gusto. El desarrollo de mercados para mejorar la seguridad, y otros atributos de calidad, requiere una certificación efectiva, seguimiento de estos atributos y comunicación a los compradores. Varios desafíos deben cumplir los procesos de seguimiento de los productos alimenticios. (Caswell et al., 2006)

Por este motivo modelos matemáticos que permitan conocer el flujo del proceso con las respectivas predicciones sobre la calidad del producto, ubicación de la materia prima, tiempo de vida útil y en su conjunto, acoplado a una técnica eficiente, de bajo costo y disponible por los agentes consumidores (mercado), buscaría la estandarización de metodología cuantitativas y cualitativas dentro de la trazabilidad de productos acuáticos.

En la industria de peces marinos, los aspectos más relevantes relacionados al mantenimiento de calidad y en especial por manejo de materias primas para piensos comerciales, tendrán una incidencia directa en la trazabilidad del producto a ser procesado. (Wood et al., 2002). Bajo estos modelos, existen varias propuestas con marcadores genéticos tipo microsatélites y SNP's. Hayes et al., (2005) propone tres estrategias de seguimiento de productos acuícolas específicamente en salmón del atlántico, enmarcados en lo siguiente: 1) FIS, emparentamiento total de las poblaciones y seguimiento de toda la cadena. 2) PAR, seguimiento sólo a los padrotes y 3) GRANPA. Seguimiento a los padrotes de origen (abuelos).

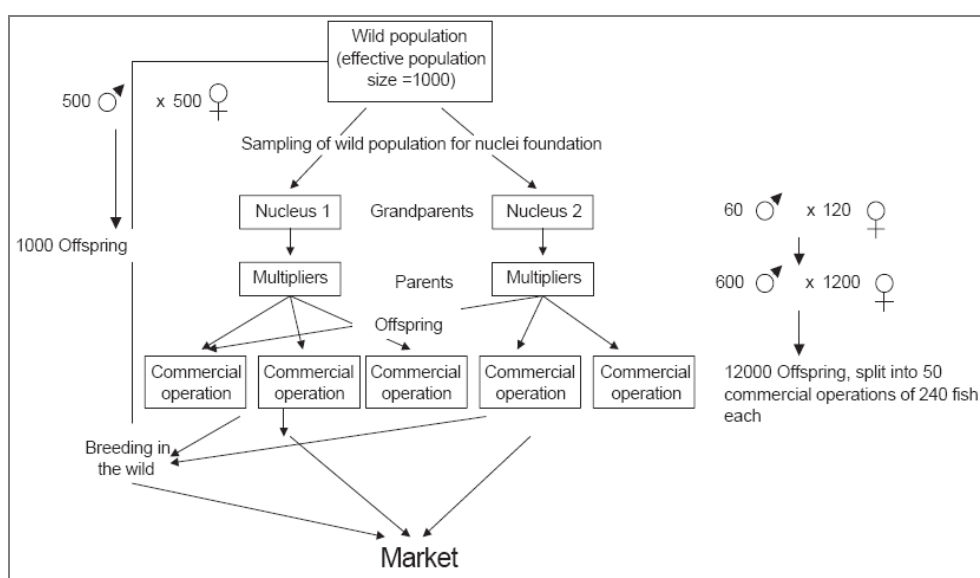


Figura 2 Modelo de simulación de marcadores moleculares para una estructura poblacional en el cultivo del Salmón del Atlántico.

En el modelo de simulación de marcadores moleculares en una población comercial, se presenta dos núcleos poblacionales, con dos reproducciones y 50 operaciones comerciales. 50 machos y 60 hembras seleccionadas de cada núcleo, para multiplicar cada línea, y 300 machos y 600 hembras fueron seleccionados de cada reproducción para el desarrollo de 12000 peces comerciales, y un corte de 240 peces por cada 50 operaciones comerciales. (Hayes et al., 2005).

Bajo esta propuesta se mencionan que la confiabilidad para asignar un correcto número de marcadores y hacer el seguimiento según las estrategias formuladas, dependerá del número de loci amplificados y la diversidad alélica y esto dado, por el número de alelos y la distribución de sus frecuencias.

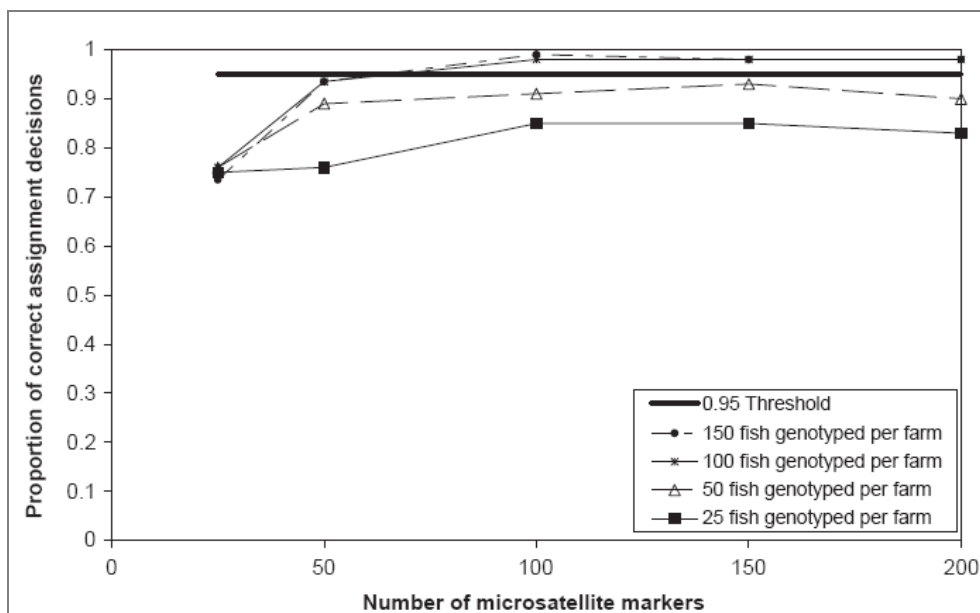


Figura 3 Estrategia FS. Correcta asignación del número de microsatélites en función del tamaño de la muestra, en 50 operaciones comerciales. (Hayes et al., 2005).

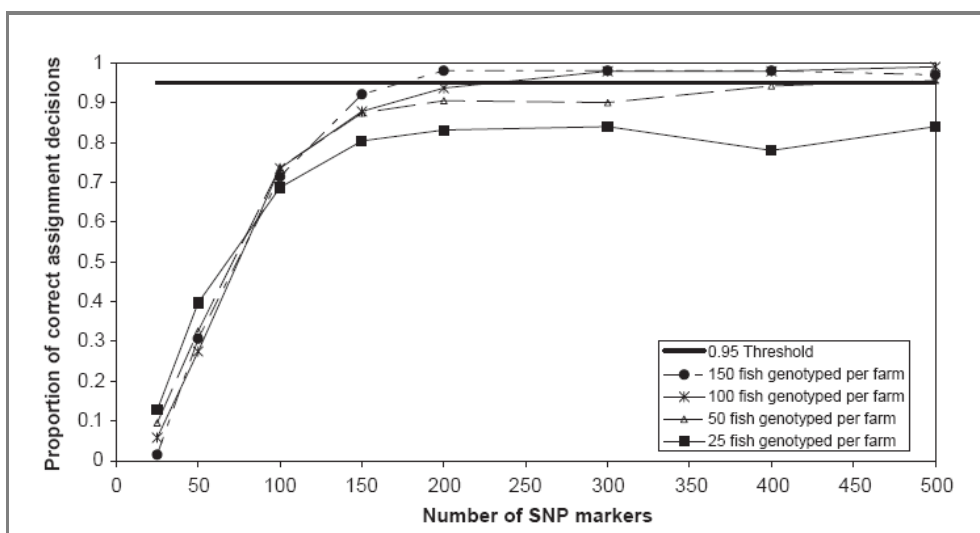


Figura 4 Estrategia FS. Correcta asignación del número de SNP en función del tamaño de la muestra, en 50 operaciones comerciales. (Hayes et al., 2005).

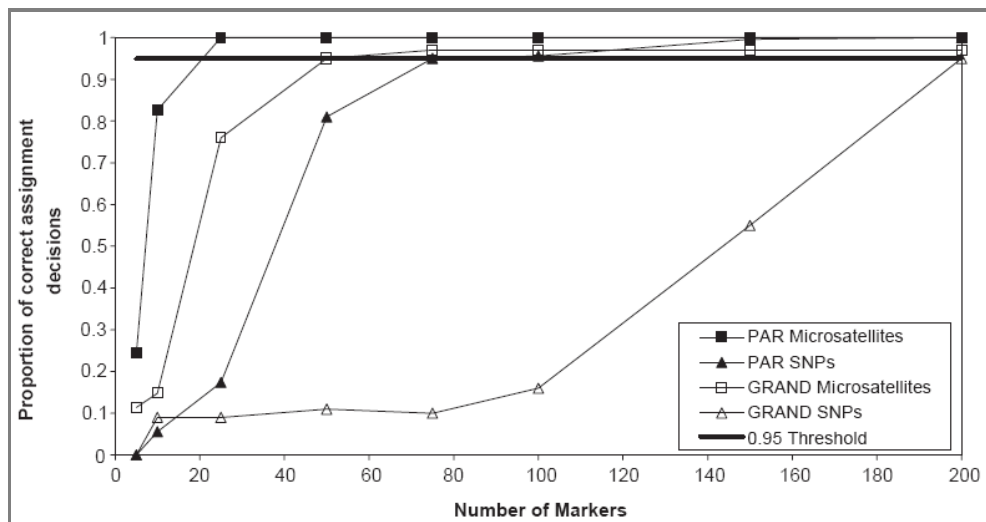


Figura 5 Proporción de asignación correcta para la toma de decisiones PAR y GRAND con marcadores SSR y SNP. (Hayes et al., 2005).

Relative genotyping costs required to achieve >0.95 correct assignment decisions for FS, PAR and GRAND		
	Microsatellites (100 fish sampled per commercial operation)	SNPs (100 fish sampled per commercial operation)
FS		
Number of markers	75	400
Cost	9,000,000	4,800,000
PAR		
Number of markers	15	75
Cost	135,000	135,000
GRAND		
Number of markers	50	200
Cost	45,000	36,000
Cost of genotyping SNP=1 unit, cost of genotyping microsatellites=5 units.		

Hayes et al., (2005) demuestra que la mejor estrategia en función de los números de marcadores es PAR, el seguimiento a parentales directos con 15 SSR y 75 SNP's. Mientras que las estrategias FS y GRAND requieren de un mayor número de marcadores, así como una estrecha relación con el costo de seguimiento y genotipado.

Otros estudios, demuestran que para poblaciones silvestres y de cultivo se requieren entre 16 y 20 microstellites o 100 SNP's para determinar un emparentamiento total o caso contrario que no exista relación entre las muestras. Sin embargo es importante recalcar que los marcadores tipo SSR son más informativos por el número de alelos por locus, mientras que los SNP's tienen máximo dos alelos por locus, lo que implica una relevancia sustancial en el uso de los mismos, es decir que por cada SSR en la estrategia GRAND se requerirán 3 SNP's.

8. HERRAMIENTAS GENÉTICAS PARA LA TRAZABILIDAD

La identificación basada en características morfológicas y organolépticas es compleja durante el proceso de elaboración de productos de la acuicultura, por ese motivo las herramientas moleculares y proteómicas son necesarias para la trazabilidad genética de productos acuícolas (Pinero et al., 2003).

En los centros de crianza en países nórdicos, los escapes de jaulas en mar abierto son frecuentes, y estimar la procedencia de peces recapturados y su posterior utilización en programas de reproducción es importante, en especial con especies nativas de alto valor comercial. En Noruega se han realizado varios estudios con el bacalao del Atlántico. Glover & Dahle (2010), utilizan 7 SSR para ubicar el gen PAN de poblaciones naturales y estimando un nivel alto de asignación (75%), pudieron detectar la identidad del producto. Bajo estas características se detectaron grupos de fugados (peces) procedentes de jaulas específicas, mientras que otros grupos de individuos tenían otra procedencia.

La determinación de la procedencia geográfica es una demanda del sistema de trazabilidad de los alimentos de importación y exportación. Una hipótesis de rastrear el origen de un producto es mediante el análisis de una manera global, a las comunidades de bacterias de las muestras de alimentos después de su exportación. Para tal efecto, las técnicas moleculares que emplean perfiles 16S ADNr generados por PCR-DGGE se utiliza para detectar la variación en las estructuras de la comunidad bacteriana en peces como el *Pangasius*. Cuando los perfiles de 16S ADNr fueron analizados se detectaron distintas comunidades microbianas. Los perfiles de grupos bacterianos de peces son diferentes en todas las granjas y específicas para cada lugar y puede ser utilizado como código de barras para certificar el origen de los peces. Bajo este comportamiento también pudieron identificar la temporalidad y sitio de producción. Algunas bandas comunes presentan un comportamiento estable a lo largo de las estaciones. Este método es una herramienta de trazabilidad que establece nuevos productos de la pesca con un código de barras único y permite rastrear el pescado a su ubicación original. (Le Nguyen & Ngoc et al., 2008).

Varios problemas detectados por la sustitución de especies acuáticas a nivel global se han detectado, y en especial en Europa, con niveles de falsificación en peces del 15 -43%, mientras que en productos marinos y específicamente en moluscos, en el orden del 75%. Diversas técnicas para la identificación han sido desarrolladas, y concretamente a partir de ADN mitocondrial, en donde se codifica genes para citocromo b y citocromo c oxidasa sub unidad I, y que son secuencias altamente conservadas, que pueden ser rastreadas, y considerarse una muestra de codificación de barras por especie. En la actualidad, se encuentran disponibles estos códigos de barras para especies principales como pequeños peces pelágicos, pargo, tilapia, escómbridos, bivalvos y salmónidos (www.fishbol.org). El tiempo utilizado para la detección de la especie varía de 2 hasta 8 horas por muestra, lo que a un nivel de confianza del 95 %, se puede detectar y determinar la especie de origen. Sin embargo la problemática puede estar determinada por la presencia de alelos nulos y la falta de

información génica y por consiguiente la oportunidad de detectar la originalidad del producto de poblaciones naturales. Estos códigos de barras han sido utilizados en Japón con *Eriocheir japonica sinensis*, el cuál ha sido sustituido en China con *E. j. hepuensis*. Para la discriminación de especies y sub especies desarrollaron marcadores tipo (SNPs) de dos secuencias génicas, permitiendo la confirmación de 17 sitios para Citocromo b y 11 sitios para secuencias COI. Estos marcadores fueron validados para estas especies. (Helberg & Morrison, 2010; Botti & Griffa, 2010; Zhang & Tang, et al., 2009)

El Abulón rojo *Haliotis rufescens*, ha sido estudiado desde una perspectiva de genética de poblaciones. Gaffney et al.,(1996) y Burton & Tegner, (2000) encontraron evidencia de una pequeña diferencia entre las poblaciones de esta especie, en locus alozima AAT-1; mientras que en otro locus de alozima y secuencias de mtDNA no encontraron diferencias significativas. De igual manera no se encontraron diferencias entre las poblaciones de *H. rufescens* del norte de California con respecto a las poblaciones del sur de California en un locus detectado por un SSR sencillo. El nivel de diferenciación del loci (alozima) es tres veces más alto en Abulón negro (*H. Cracherodii*) que el observado en *H. Rufescens*. Ambas especies difieren en su período de reproducción y se sugiere que en verano limita su dispersión larval y reduce la varianza en condiciones oceanográficas en comparación al Abulón rojo, el cual desova constantemente durante el año. (Hamm, 2000). De esta manera se experimenta mayor exposición a las condiciones oceanográficas, ocasionando una divergencia en su genética poblacional. Tegner, (1993), menciona este efecto, para explicar la recuperación rápida de poblaciones de Abulón rojo en relación a otras especies de Abulón predominantes en esa zona y frente a la destrucción de bancos de macro algas en la península de Palos Verdes.

Existe evidencia que poblaciones de abalones han sufrido cambio en la composición genética debido a la propagación de la semilla artificial. Las Alienzimas utilizadas como marcadores, son efectivas para la rastreabilidad de poblaciones provenientes de la producción de semilla natural y actividades de repoblamiento. Estas herramientas son de gran utilidad junto con un adecuado monitoreo de las prácticas de manejo de reproductores para una buena implementación de programas de producción comercial y repoblamiento. (Gaffney et al., 1996)

En Chile, el uso de herramientas moleculares para propósitos de trazabilidad, han generado resultados satisfactorios en moluscos. Aguilera et al., (2008) analizó cinco especies de moluscos comerciales chilenos mediante marcadores moleculares tipo ITS, para secuencias parciales de la región ribosomal ITS1-5.8 SrDNA-ITS2. Se analizaron 8 especies de moluscos, 5 presentaciones comerciales y 3 especies procesadas. En todos los casos se pudo amplificar bandas, siendo altamente específicos en todos los casos y reproducibles independientemente de la presentación comercial. La presencia de fraude por sustitución de especies entre Abulón en conserva (*Haliotis*) y loco (*Concholepas*) es uno de los temas importantes, que se pudo resolver en esta investigación. En la región ITS 2 para la especie de *H. rufescens*, demuestran que el tamaño del alelo es de 390 pb, en comparación con el murícido (loco) con 520 pb.

Giovambattista (2001) indica que el uso de una batería de marcadores moleculares altamente polimórficos, con herencia mendeliana simple y alelos de tipo codominante (microsatélites) puede resolver casos de paternidad discutida y procesos de trazabilidad. Análisis estadísticos de microsatélites con una probabilidad cercana a la unidad demuestran que el análisis de polimorfismo del DNA es una herramienta de utilidad para resolver identificación individual. Esta técnica es útil en el seguimiento de programas de mejoramiento basados en selección familiar para comprobar el manejo adecuado de cruces.

El uso de ESTs para desarrollo de marcadores tipo microsatélite ha sido demostrado previamente. Yue et al., (2004) identifica 36 nuevos microsatélites para la carpa común (*Cyprinus carpio*) obtenidos en genes depositados en GenBank, en secuencias EST desarrolladas de librerías de cDNA y librerías genómicas enriquecidas con repeticiones de CA. El mismo autor menciona que todos, excepto dos, fueron polimórficos con un número promedio de 7.3 alelos /locus. Microsatélites localizados en genes y en ESTs muestran alto número de alelos comparados con aquellos aislados de una librería genómica de DNA (7.7/locus vs

4.9/locus). Se demuestra que existe una tasa de transferencias del 41.7% inter - especie, con la carpa silvestre (*Carassius auratus gibelio*).

Para mapear el siluro de canal (*Ictalurus punctatus*) se escogió y secuenció aleatoriamente 100 cDNA de una biblioteca de pituitaria de la misma especie. Las secuencias EST se utilizaron para diseñar primers y amplificar los DNA genómicos de: siluro de canal y siluro azul (*I. furcatus*). Los productos de PCR de ESTs se analizaron para determinar polimorfismo. Once marcadores polimórficos de EST se identificaron. Cinco de los 11 marcadores de EST eran de genes conocidos y los otros seis eran de ESTs no identificados. Siete ESTs se asociaron a secuencias de microsatélites. El análisis de secuencias de genes del siluro de canal indica alta influencia en secuencias codantes (exones), demostrando su expresión en proteína ribosomal y hormonas (Liu et al., 1999).

Los microsatélites genómicos son ampliamente utilizados y proveen una alta calidad en los datos, pero generalmente la alta especificidad de primers no pueden ser utilizados a nivel taxa, con otras especies. En cambio los marcadores basados en ESTs o intrones pueden proveer amplia información sobre polimorfismo nuclear usando "primers universales", altamente transferibles entre especies cercanas. Generalmente son polimórficos, algunas veces hipervariables, de naturaleza codominantes y en el caso de intrones se presume selectividad neutral. Al igual que los microsatélites genómicos, los EST-SSRs y los EPICs, son fácilmente amplificables por PCR, se visualizan en geles de poliacrilamida, y en gran número pueden ser obtenidos a bajo costo cuando existe información previa depositada en los bancos de secuencias genéticas (Palumbi y Baker, 1994; Bierne et al., 2000; Touriya et al., 2003).

SSR desarrollados a partir de EST para *Haliotis discus hannai* fueron desarrollados. Motivos de repetición fueron encontrados en 4,95% de EST, a una frecuencia de repetición de 10.04 kb de secuencias EST. 17 marcadores fueron desarrollados. El número de alelos por locus varió de 2 a 17 con un promedio de 6 a 8 alelos por locus. La heterocigocidad esperada y observada fue de 0,132 y 0,922. Doce de los 17 marcadores, amplificaron para *H. diversicolor*, es decir un 70,6% de respuesta. Se realizó el seguimiento en 3 grupos familiares para *Haliotis discus hannai*, teniendo la segregación de 17 loci, pero también se identificaron la presencia de alelos nulos. Bajo estas características EST - SSR, es una herramienta importante para mapeo genético, selección asistida, estudios de evolución y seguimiento de poblaciones locales. Es importante mencionar que en este trabajo se procesó 1476 secuencias génicas, las cuales se encuentran disponibles en Gen Bank y existen disponibles para *Haliotis* 4500 secuencias. (Li Qi et al., 2010).

En el trabajo de Touriya et al. (2003), desarrolló cinco pares de primers para regiones conservadas de exones flanqueando intrones de interés. Se probaron en 16 especies marinas y peces de agua dulce, reptiles y mamíferos (humanos y camélidos). El objetivo de este estudio fue demostrar el grado de universalidad de primers intrónicos. Para peces, la tasa de éxito en la amplificación fue del 93%, además, se compararon muy bien con marcadores moleculares desarrollados para otras especies, especialmente polimorfismo. La mayoría de fragmentos tuvieron longitudes entre 100 y 1000 bp. Las amplificaciones mostraron perfiles capaces de discriminar especies y para estudios intra-específicos. Otro estudio en peces, Hasson, (2002) demostró que de 17 intrones, 14 (82%) son polimórficos, con un tamaño de 2 a 14 alelos. Liu, (2003) determina que las secuencias intrónicas en *Ictalurus punctatus*, son altamente variables y contienen microsatélites. En ese trabajo de 50 secuencias evaluadas 42 (84%) productos amplificaron, y 19% incluye secuencias con microsatélites. Estudios en maíz y avena demuestran que el 46 y 58% de marcadores intrónicos son polimórficos para cada especie (Holland et al., 2001).

9. DISCUSIÓN

A medida que el comercio mundial y el mercado de productos del mar crece, también se generan varios problemas relacionados a la trazabilidad y que son: nivel de sustitución de

especies de alto valor comercial por otras, cambios de nombre, etiquetado incorrecto, seguridad comercial, industrial y de prototipos, falencias en las certificaciones nacionales y en varios casos de las internacionales. Muchos de estos problemas se deben básicamente a la falta de leyes que regulen el comercio de especies, y sin considerar el riesgo por la transferencia de enfermedades, toxinas y sobre todo, por la sostenibilidad que representan estos riesgos para una empresa. Se tiene conocimiento de la producción de abulones híbridos entre especies americanas y especies exóticas como el abulón verde (*Haliotis discus hanai*). Esta producción, sin control de híbridos, puede ocasionar problemas de nuevas enfermedades, como el caso del virus herpes en Australia, producto en principio, por la hibridación entre el blacklip abalone (*Haliotis rubra*) y el greenlip abalone (*Haliotis laevigata*) Lozano, 2010 (comunicación personal). Cabe destacar, la debilidad en los controles internos de cada granja, en donde los puntos críticos están en cada una de las actividades en los procesos y la especificidad y sensibilidad de las técnicas utilizadas. Un aspecto trascendente dentro del análisis se basa en la falta de información genética en todos los componentes vivos, desde las poblaciones de origen, así como, de las generaciones producidas. (Jacquet & Pauly, 2008).

Dentro de una posible tendencia comercial en América, está el traslado de capital Chileno a México para la inversión en el cultivo de abulón, debido a la ventaja comparativa de costos de producción, así como la disponibilidad de cuatro especies nativas, (*Haliotis cacherodii*, *Haliotis rufescens*, *Haliotis fulgens* y *Haliotis corrugada*), las cuales tienen un mayor valor comercial que las especies cultivadas. Este posible crecimiento de la Industria, pudiese tener un impacto en las poblaciones naturales de América, por lo que la trazabilidad mediante marcadores moleculares es una herramienta indispensable como fortaleza de un proyecto.

En esta investigación bibliográfica presentamos tecnologías que se pueden implementar en la industria como estrategias confiables para la trazabilidad de poblaciones naturales y de cultivo para abulón rojo. Cabe destacar que mucho trabajo en esta especie no está desarrollado y la disponibilidad de marcadores que cumplan todas las exigencias con un nivel de confianza elevado para el seguimiento de poblaciones es escasa, así como para el apoyo de trazabilidad en toda la cadena de producción.

Un enfoque importante que consideramos es, básicamente el desarrollo de marcadores moleculares de diferente índole como los EST – SSR e intrones, mediante el minado de datos y demostrado en el estudio de Li Qi, 2010. Un enfoque semejante ha sido utilizado en varias especies animales (Yue et al., 2001; Rohrer et al., 2002; Yue y Orban, 2002; Yue et al., 2004) y plantas (Kantety et al., 2002; Gupta et al., 2003; Woodhead et al., 2003; y otros). El desarrollo de marcadores moleculares en base a minado de datos, tiene ventajas por su accesibilidad y bajo costo, en comparación con esfuerzos y procedimientos tradicionales como son las librerías genómicas para desarrollar marcadores tipo microsatélites. La exploración de datos y búsqueda de EST-SSR se realiza cuando disponemos de gran cantidad de secuencias con estas características. Sin embargo, su uso a nivel taxa, donde el número de secuencias EST es bajo o no está disponible, requiere de grandes esfuerzos que permiten aislar microsatélites en librerías genómicas enriquecidas, debido a la naturaleza redundante de cDNA.

Una ventaja teórica de marcadores SSR desarrollados a partir de secuencias EST es la alta transferibilidad entre especies relacionadas. También, cabe recalcar la universalidad y transferibilidad de primers intrónicos, que ha sido demostrada previamente en Teleosts con la amplificación en 16 especies de peces marinos y agua dulce, además de dos mamíferos y un reptil (Touriya et al., 2003).

Con la utilización de exploración de datos en secuencias EST para plantas, se han identificado centenares de marcadores SSR en diferentes especies (Thiel et al., 2003). Aunque un número exacto de EST-SSRs generados por exploración de datos en secuencias ESTs públicamente disponibles, ha sido reportado previamente en cerdo (Rohrer et al., 2002), genetistas dedicados en genética animal no han aprovechado la alta disponibilidad de

secuencias EST en bases de datos públicos. La disponibilidad de ESTs para diferentes especies animales es alta (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) y combinado con el uso de un nuevo servicio en la web para búsqueda de microsatélites y diseño de primers (<http://hornbill.cspp.latrobe.edu.au/cgi-bin/pub/index.pl>) (Robinson et al., 2004), el aislamiento de SSR se vuelve muy simple. Para ilustrar este punto examinamos mil ESTs, cada una en tres especies diferentes (aves de corral *Gallus gallus*, cerdo *Sus scrofa* y el salmón del atlántico (*Salmo salar*) se generaron primers EST-SSR en 6,8, 8,5 y 5,7% respectivamente. En el caso especial de *Salmo salar*, cuyo mapa de ligamiento comprende 64 marcadores (Gilbey et al., 2004), para abril del 2004, hubo 87.982 secuencias EST depositadas en NCBI. Asumiendo una tasa de éxito del 1% en el desarrollo de marcadores, alrededor de 900 marcadores EST-SSR nuevos se podrían probar para polimorfismo y ligamiento. Los porcentajes de EST-SSRs en aves de corral, cerdo, salmón y camarón están en el mismo rango y gama para plantas (Saha et al., 2003), lo cual señala una fuente importante de información útil. Adicionalmente el diseño de marcadores tipo intrón basados en homologías con genomas completos, como es el caso de *D. melanogaster*, *Aphis mellifera* o *Anopheles gambiae* podría generar cientos o probablemente miles de marcadores útiles para especies poco estudiadas desde el punto de vista genético como el *Halotis rufescens*.

Este trabajo permite como alternativa proponer, que una aproximación de bajo costo mediante minado de datos y comparación de homologías, podría ser útil para la generación de marcadores codominantes tipo EST-SSRs, EST-SSCPs e intrones para *Halotis rufescens*. La implementación de estas técnicas a escala mayor, abre interesantes líneas de investigación con presupuestos manejables localmente.

10. REFERENCIAS

1. Aguilera-Munoz, F., V. Valenzuela-Munoz, et al. (2008). "Authentication of Commercial Chilean Mollusks Using Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) as Species-Specific DNA Marker." *Gayana* 72(2): 178-187.
2. Alcivar-Warren, A. 2001. Biotechnology and Aquaculture Interface: The site of Maximum Impact Workshop. Application of Biotechnology to Address Shrimp Industry Development and Environmental and Public Health Issues. . ARS-OI Biotechnology-Aquaculture Workshop.
3. Argue, B., S. Arce, J. Lotz and S. Moss. 2002. Selective breeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) for growth and resistance to Taura Syndrome Virus. *Aquaculture* 204: 447 – 460.
4. Bailey (2004). Benefits and costs associated by an animal identification system for cattle in the United States (pp. 1-11) Western Extension Marketing Committee.
5. Bello, N. 2001. Desarrollo de Marcadores Moleculares en el Avestruz. (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 60p.
6. Bierne, N., E. Lehnert, E. Bédier, F. Bonhomme and S. Moore. 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon – primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology* 9: 233 –235.
7. Bierne, N., I. Beuzart, V. Vonau, F. Bonhomme, and B. Bédier. 2000. Microsatellite-associated heterosis in hatchery-propagated stocks of the shrimp *L. stylirostris*. *Aquaculture* 184: 203-219.
8. Borresen, T. (2008). "SEAFOODplus - How to provide health promoting, safe seafood of high eating quality to consumers." *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit-Journal of Consumer Protection and Food Safety* 3(1): 15-18.
9. Botti, S. and E. Giuffra (2010). "Oligonucleotide indexing of DNA barcodes: identification of tuna and other scombrid species in food products." *Bmc Biotechnology* 10: -.
10. Bradley, R. and D. Hills. 1997. Recombinant DNA sequences generated by PCR amplification. *Molecular Biology Evolution* 14: 592- 593.
11. Burton, R.S., Tegne, M.J., 2000 Enhancement of red abalone (*Halotis rufescens*) stock at San Miguel Island: reassessing a success story. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 2000, 303-308

12. Caswell, J. A. (2006). "Quality assurance, information tracking, and consumer labeling." *Marine Pollution Bulletin* 53(10-12): 650-656.
13. Clayton 2002
14. Comeron, J. and M. Kreitman. 2000. The Correlation between Intron Length and Recombination in *Drosophila*: Dynamic Equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics* 156: 1175-1190
15. Davis, G. and D. Hetzel. 2000. Integrating molecular genetic technology with traditional approaches for genetic improvement in aquaculture species. *Aquaculture research* 31: 3-10.
16. Duda, T. and R. Palumbi. 1999. Population structure of the black tiger prawn, *penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western pacific populations. *Marine Biology* 134: 705-710
17. Espinosa G., M. Jager, E. García-Machado, Y. Borell, N. Corona, A. Robainas and J. Deutsch. 2001. Microsatellites from the white shrimp *LitoL. schmitti* (Crustacea, Decapada). *Biotechnología aplicada* 18: 232-234.
18. Falconer, D. 1989. *Introduction to Quantitative Genetics*, 3rd edn. Longman, Essex.
19. FAO. Fishstat 2008
20. Ferreira, M. y D. Gratapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. 1 ed. Brasilia: Embrapa-Cenargen 220p
21. Fornzler, D., H. Her, E. Knapik, M. Clark, H. Lehrach, J. Postlethwait, L. Zon and D. Beier. 1998. Gene Mapping in zebrafish using single-strand conformation polymorphism analysis. *Genomics* 51(2):216 –22.
22. France, S., N. Tachino, T. Duda, R. Shleser, and S. Palumbi. 1999. Intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei*: multiple polymorphic elongation Factor-1 α loci revealed by intron sequencing. *Marine Biotechnology* 1:261–268
23. Gaffney, P.M., Scott, T.M., Kowhn, R.K., Diehl, W.J., 1990. Interrelationships of heterozygosity, growth rate and heterozygote deficiencies in the coot clam, *Mulinia lateralis*. *Genetics* 124, 687-699.
24. Gibson & Muse. *A Primer of Genome Science*, 2nd Edition. Sinauer Associates. 2004
25. Gilbey, J., E. Verspoor, A. McLay and D. Houlihan. 2004. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Animal Genetics* 35: 98-105.
26. Giovambattista, G., M. Ripoli, J. Lirón, M. Kienast, E. Villegas, F. Castagno y P. Peral. 2001. Aplicación de las Técnicas de Polimorfismo de DNA en la resolución de casos de Abigeato, identificación individual y determinación de Paternidad. *Analecta veterinaria* 21(1): 5-11
27. Glover, K. A., G. Dahle, et al. (2010). "Genetic diversity within and among Atlantic cod (*Gadus morhua*) farmed in marine cages: a proof-of-concept study for the identification of escapees." *Animal Genetics* 41(5): 515-522.
28. Golan, E. Krissoff, B. & Kuchler, F (2005) Food traceability: One ingredient in a safe and efficient food supply. *Prepared foods* (January Issue), 59-70
29. Gupta, P., S. Rustgi, S. Sharma, R. Singh, N. Kumar and H. Balyan. 2003. Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics Genomics* 270: 315-23.
30. Hamm, R.S. Burton., 2000. Population genetics of black abalone, *Haliotis cracherodii*, along the central California coast, Scripps Institution of Oceanography, University of California
31. Hare, M. and S. Palumbi. 2003. High intron sequence conservation across three mammalian orders suggests functional constraints. *Molecular Biology and Evolution* 20: 969–978.
32. Hastein, T., B. J. Hill, et al. (2001). "Traceability of aquatic animals." *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties* 20(2): 564-583.
33. Hayes, B., A. K. Sonesson, et al. (2005). "Evaluation of three strategies using DNA markers for traceability in aquaculture species." *Aquaculture* 250(1-2): 70-81.
34. Helberg & Morrison. 2010. *Advances in DNA-Based Techniques for the Detection of Seafood Species Substitution on the Commercial Market*. Food Science and Technology, Food Innovation Center, Oregon State University, Portland, OR.

35. Holland, J., S. Helland, N. Sharapoya and D. Rhyne. 2001. Polymorphism of PCR-based markers targeting exons, introns, promoter regions, and SSRs in maize and introns and repeat sequences in oat. *Genome* 44: 1065-1076.
36. Humphries, E., V. Gudnason, R. Whittall, and N. Ian. 1997. Single – strand conformation polymorphism análisis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hipercolesterolemia. *Clinical Chemistry* 43(3): 427 – 435.
37. IdentiGEN (2004). Farm to fork traceability through DNA traceback. Mimeograph Report (pp. 1-3). Identi GEN, Ltd., Dublin, Ireland.
38. Jacquet J. (2007). Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood. Marine Policy. The sea around us project. The fisheries centre University of British Columbia.
39. Jacquet, J. L. and D. Pauly (2008). "Trade secrets: Renaming and mislabeling of seafood." *Marine Policy* 32(3): 309-318.
40. Jacquet, J., J. Hocevar, et al. (2010). "Conserving wild fish in a sea of market-based efforts." *Oryx* 44(1): 45-56.
41. Jensen, T. K., J. Nielsen, et al. (2010). "The Fish Industry Toward Supply Chain Modeling." *Journal of Aquatic Food Product Technology* 19(3): 214-226.
42. Jiang, S. T. (2010). "The Quality Control Status of Cobia, *Rachycentron canadum*, and Grouper, *Epinephelus malabaricus*, in Taiwan." *Journal of the World Aquaculture Society* 41(2): 266-273.
43. Kantety, R., M. La Rota, D. Matthews and M. Sorrells. 2002. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Molecular Biology* 48: 501-51.
44. Le Nguyen, D. D., H. H. Ngoc, et al. (2008). "Determination of fish origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacterial communities by PCR-DGGE: An application on *Pangasius* fish from Viet Nam." *Food Control* 19(5): 454-460.
45. Lessa, E. 1992. Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution* 9: 323-330
46. Li, Qi, 2010.2010. Characterization of genic microsatellite markers derived from expressed sequence tags in Pacific abalone (*Haliotis discus hanna*). *Chinese journal of oceanology and limnology* [0254-4059], vol.:28 iss:1 pág.:46 -54
47. Li, Y., A. Korol, T. Fahima and E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6):991-1007.
48. Liao, I. C. and N. H. Chao (2009). "Aquaculture and food crisis: opportunities and constraints." *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 18(4): 564-569.
49. Liu, Z., A. Karsi and R. Dunham. 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of catfish. *Marine Biotechnology* 1: 465-476.
50. Liu, Z., A. Karsi and R. Dunham. 1999. Development of Polymorphic EST Markers Suitable for Genetic Linkage Mapping of catfish. *Marine Biotechnology* 1: 465-476.
51. Marine Genomic : <http://www.marinegenomics.org>
52. Meehan, D., Z. Xu, G. Zúñiga and A. Alcívar – Warren. 2003. High frequency and large number of Polymorphic microsatellites in cultured shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus vannamei*) (Crustácea:Decapoda). *Marine Biotechnology* 5: 311–330.
53. Miller, M. 1997. Tools for Population Genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for analysis of allozyme and molecular population data. Computer software distributed by the author.
54. Moore, S., V. Whan., G. Davies, K. Byrne, D. Hetzel and P. Niegel. 1999. The development and application of genetics markers for the Kuruma prawn *M. japonicus*. *Aquaculture* 173: 19-32.
55. NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
56. O'Brien, S. 1991. Molecular genome lapping: lessons and prospects. *Genetic Development* 1: 105-111.
57. Palumbi, S. and S. Baker. 1994. Contrasting populations structure from Nuclear Intron Sequences and mtDNA of Humpback Whales. *Molecular Biology and Evolution* 11: 426-435.
58. Perez & Ortiz, 2005. Desarrollo de maracadores moleculares tipo SSR en secuencias EST para *L. vanamei*. *Marine Biotechnology* 18(4): 564-569..

59. Pineiro, C., J. Barros-Velazquez, et al. (2003). "Proteomics as a tool for the investigation of seafood and other marine products." *Journal of Proteome Research* 2(2): 127-135.
60. Robinson, A., C. Love, J. Batley, G. Barker and D. Edwards. 2004. Simple sequence repeat marker loci discovery using SSR primer. *Bioinformatics*. In press.
61. Rohrer, G., S. Fahrenkrug, D. Nonneman, N. Tao and W. Warren. 2002. Mapping microsatellite markers identified in porcine EST sequences. *Animal Genetics* 33: 372-376.
62. Rojtinnakorn, J., I. Hirono, T. Itami, Y. Takahashi and T. Aoki. 2002. Gene expression in haemocytes of Kuruma prawn, *M. japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish & Shellfish Immunology* 13: 69-83.
63. Russell, Peter. 1992. *Genetics*, 3rd edition. Harper Collins Publishers.
64. Saha, S., M. Karaca, J. Jenkins, A. Zipf, O. Reddy, K. Umesh and R. Kantety. 2003. Simple sequence repeats as useful resources to study transcribed genes of cotton. *Euphytica* 130: 355-364.
65. Saunders, L. (2004). Consumer, retail foodservice and export market: Expectations (pp.1-10). Presented to the North American Limusin Visions Symposium.
66. Scott, D. 2001. Microsatellites Derived from ESTs, and their Comparison with those Derived by Other methods. CAB International. *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting*: 225 – 237.
67. Serapion, J., H. Kucuktas, J. Feng and L. Shanjiang. 2004. Bioinformatic Mining of Type I Microsatellites from Expressed Sequence Tags of Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture Abstracts, Marine Biotechnology*, 1436-2236.
68. Shahjahan, R., K. Hughes, R. Leopold and J. DeVault. 1995. Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques* 19: 332-4.
69. Silva, E. and M. Russo. 2000. Techniques and statistical data analysis in molecular population genetics. *Hidrobiology* 420:119-135
70. Small, M. and E. Gosling. 2000. Species relationships and population structure of *Littorina saxatilis* Olivi and *L. tenebrosa* Montagu in Ireland using single- strand conformational polymorphisms (SSCPs) of cytochrome b fragments. *Molecular Ecology* 9:39-52.
71. Sparks (2002). Food traceability in beef supply chains: Trends in mayor producing and trading countries. Amherst: Department of Resource Economics, University of Massachusetts, <http://www.umas.edu/resee/workingpapers,htm>
72. Subpesca 2009. www.subpesca.cl
73. Suhnel, C., F. A. D. Cruz, et al. (2008). "Traceability Management System for the Mussel Supply Chain." *Boletim Do Instituto De Pesca* 34(4): 577-584.
74. Tassanakajon, A., A. Tiptawonnukul, P. Supungul, V. Rimphanitchayakit, D. Cook, P. Jarayabhand, S. Klinbunga, and V. Boonsaeng1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7(1): 55 – 61.
75. Tegner, M.J., Demartini, J.D. And Karpov, K.A., 1992. The California red abalone fishery a case study in complexity. In: S.A. Shepard, M.J. Tegner and S.A. Guzmán del Prío. *Abalone of the World. Biology. Fisheries and Culture*, fishing News Books, Cambridge, pp. 370-383.
76. Thiel, T., W. Michalek, R. Varshney and A. Graner. 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare*). *Theoretical Application in Genetic* 106: 411-422.
77. Tong, J., S. Lehnert, K. Byrne, H. Kwan, and K. Chu. 2002. Development of polymorphic EST markers in *Penaeus monodon*: applications in penaeid genetics. *Aquaculture* 208: 69 –79.
78. Touriya, A., M. Rami, G. Cattaneo-Berrebi, C. Ibanez, S. Augros, E. Boissin, A. Dakkak and P. Berrebi. 2003. Primers for epic amplification of intron sequences for fish and other vertebrate population genetic studies. *Biotechniques* 35:676-682

79. Turchini, G. M., G. P. Quinn, et al. (2009). "Traceability and Discrimination among Differently Farmed Fish: A Case Study on Australian Murray Cod." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(1): 274-281.
80. Van der Werf. 1989. Introduction to some aspects of molecular genetics. University New England. Australia. 35-43p.
81. Winkler, 2010. Programa de Doctorado en Acuicultura. UCN- Chile.
82. Wood, L. (2002). "Feed and food safety in the farmed Atlantic salmon industry." *Geography* 87: 160-163.
83. Woodhead, M., J. Russell, J. Squirrell, P. Hollingsworth, L. Cardle, L. Ramsay, M. Gibby and W. Powell. 2003. Development of EST-SSRs from the Alpine Lady-fern, *Athyrium distentifolium*. *Molecular Ecology* 3: 287-290.
84. Yue, G. and L. Orban. 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology* 2: 99-100.
85. Yue, G., M. Ho, L. Orban and J. Komen. 2004. Microsatellites within genes and ESTs of common carp and their applicability in silver crucian carp. *Aquaculture*. In press.
86. Yue, G., Y. Li and L. Orban. 2001. Characterization of microsatellites in the IGF-2 and GH genes of Asian seabass (*Lates calcarifer*). *Marine Biotechnology* 3: 1-3.
87. Zhang, D. and G. Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations. *Molecular ecology* 12: 563 –584.
88. Zhang, D. Z., B. P. Tang, et al. (2009). "Molecular authentication of the fashionable dainty *Eriocheir japonica sinensis* based on mitochondrial DNA bar coding." *European Food Research and Technology* 230(1): 173-178.